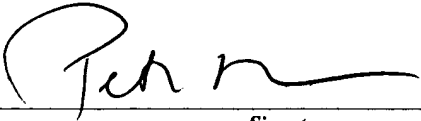


824634

<b>TRANSMITTAL LETTER</b> <b>(General - Patent Pending)</b>				Docket No. 15111	
In Re Application Of: <b>Kunio Hori, et al.</b>					
Application No. <b>09/995,100</b>	Filing Date <b>November 27, 2001</b>	Examiner <b>Frank Wei Min Lu</b>	Customer No. <b>23389</b>	Group Art Unit <b>1634</b>	Confirmation No. <b>3176</b>
Title: <b>METHOD FOR DETERMINING POLYMORPHISM</b>					
<u>COMMISSIONER FOR PATENTS:</u>  Transmitted herewith is:  <ul style="list-style-type: none"> <li>- Response To The Office Communication of May 3, 2005</li> <li>- Copies of Three (3) Certified Priority Documents for Japan Application Nos. 2000-087500, 2000-87501, and 2000-087504</li> <li>- VIA HAND DELIVERY</li> </ul> in the above identified application.  <input checked="" type="checkbox"/> No additional fee is required. <input type="checkbox"/> A check in the amount of _____ is attached. <input checked="" type="checkbox"/> The Director is hereby authorized to charge and credit Deposit Account No. <b>19-1013/SSMP</b> as described below. <div style="margin-left: 40px;"> <input type="checkbox"/> Charge the amount of _____  <input type="checkbox"/> Credit any overpayment.  <input checked="" type="checkbox"/> Charge any additional fee required. </div> <input type="checkbox"/> Payment by credit card. Form PTO-2038 is attached. <b>WARNING: Information on this form may become public. Credit card information should not be included on this form. Provide credit card information and authorization on PTO-2038.</b>					
 _____ Signature			Dated: <b>May 31, 2005</b>		
<b>Peter I. Bernstein</b> <b>Registration No. 43,497</b> <b>Scully, Scott, Murphy &amp; Presser</b> <b>400 Garden City Plaza-Ste 300</b> <b>Garden City, New York 11530</b> <b>(516) 742-4343</b>			<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to the "Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450" [37 CFR 1.8(a)] on _____  _____  (Date)  _____  Signature of Person Mailing Correspondence  _____  Typed or Printed Name of Person Mailing Correspondence </div>		
cc: <b>PIB/XZ:ab</b>					



**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

<b>Applicant(s):</b>	Kunio Hori, et al.	<b>Examiner:</b>	Frank Wei Min Lu
<b>Serial No.:</b>	09/995,100	<b>Art Unit:</b>	1634
<b>Filed:</b>	November 27, 2001	<b>Docket:</b>	15111
<b>For:</b>	METHOD FOR DETERMINING POLYMORPHISM	<b>Dated:</b>	May 31, 2005

**Confirmation No.:** 3176

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

**Response To The Office Communication of May 3, 2005**

Sir:

In the Office Communication dated May 3, 2005, the Examiner indicates that certified copies of the priority documents are not found in the file, and that a copy of the returned postcard is not sufficient evidence of the submission of the certified copies of the priority documents.

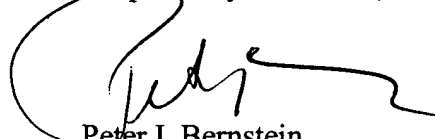
---

**THIS CORRESPONDENCE IS BEING HAND DELIVERED**

In response, Applicants are resubmitting certified copies of the priority documents,  
Japan Application Nos. 2000-087500, 2000-87501, and 2000-087504.

In view of the foregoing amendments and remarks, it is firmly believed that the  
subject application is in condition for allowance, which action is earnestly solicited.

Respectfully submitted,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Peter I. Bernstein", is written over a large, faint circular stamp or watermark.

Peter I. Bernstein

Registration No. 43,497

Scully, Scott, Murphy & Presser  
400 Garden City Plaza-STE 300  
Garden City, New York 11530  
(516) 742-4343

XZ:ab

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2000年 3月27日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2000-087500

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号  
The country code and number  
of your priority application,  
as used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

J P 2000-087500

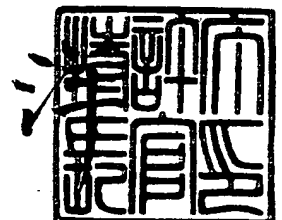
CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

願 人  
Applicant(s): オリンパス株式会社

2005年 5月20日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特2005-3043932

【書類名】 特許願

【整理番号】 A009905500

【提出日】 平成12年 3月27日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/483

【発明の名称】 多型遺伝子の型を決定する方法

【請求項の数】 3

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリnpas光学工業株式会社内

    【氏名】 唐木 幸子

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリnpas光学工業株式会社内

    【氏名】 嘉納 時男

【特許出願人】

    【識別番号】 000000376

    【氏名又は名称】 オリnpas光学工業株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100058479

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 鈴江 武彦

    【電話番号】 03-3502-3181

【選任した代理人】

    【識別番号】 100084618

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 村松 貞男

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100068814

【弁理士】

【氏名又は名称】 坪井 淳

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100100952

【弁理士】

【氏名又は名称】 風間 鉄也

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100097559

【弁理士】

【氏名又は名称】 水野 浩司

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011567

【納付金額】 21,000円

## 【その他】

国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成 1 0 年度新エネルギー・産業技術総合開発機構「多型遺伝子の型を決定する方法」委託研究、産業活力再生特別措置法第 3 0 条の適用を受けるもの）

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9602409

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 多型遺伝子の型を決定する方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ポリヌクレオチド中に含まれる多型部位の塩基配列が多型配列 $PS_1 \sim PS_n$  ( $n$ は2以上の整数)の何れであるかを決定する方法であって、

前記ポリヌクレオチドを含む検体を準備する工程と、

検出可能な標識がラベルされた核酸プローブ $PR_1 \sim PR_n$ であって、前記多型配列 $PS_1 \sim PS_n$ と特異的に結合し得る核酸プローブ $PR_1 \sim PR_n$ と前記検体とを混合することにより、前記核酸プローブ $PR_1 \sim PR_n$ を前記ポリヌクレオチドに結合せしめる工程と、

微小空間内に存在する前記核酸プローブ $PR_1 \sim PR_n$ を検出する工程と、

検出結果を解析して、 $PR_1 \sim PR_n$ のうちの何れが前記ポリヌクレオチドに結合したかを決定することにより、前記多型部位の塩基配列が多型配列 $PS_1 \sim PS_n$ の何れであるかを決定する工程と

を具備する方法。

【請求項 2】 前記検出が共焦点顕微鏡によって行われ、且つ前記解析が蛍光相関分光法によって行われることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記ポリヌクレオチドがヒト組織適合性抗原の遺伝子であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ポリヌクレオチド中の多型配列を決定するための方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年のゲノムサイエンスの進展により、特定の疾病と遺伝子の多型との関連が急速に明らかになりつつあるため、遺伝子の多型分析は、遺伝的疾患を診断する上で極めて有用となるものと期待されている。ヒトの場合、各個体のゲノムDNAの同一性は99%を超え、ヒトの多型遺伝子には、ごく僅かな塩基配列の相違が存

在するにすぎないため、ヒトの多型分析としては、単ヌクレオチド多型（SNP；Single Nucleotide Polymorphism）の分析が特に注目されている。

#### 【0 0 0 3】

現在、遺伝子の多型分析法としては、血清学的方法とDNAを用いた方法が主に使用されているが、後者は前者に比べて判定に試験者の熟練を要さず、検査工程の自動化が可能であるという利点を有している。

#### 【0 0 0 4】

DNAを用いた方法にも種々の変法があるが、その多くは、PCRによる増幅、標識されたプローブと増幅産物とのハイブリダイゼーション、標識物質の検出等の周知技術を組み合わせたものである。

#### 【0 0 0 5】

これらの方法は、血清学的方法と比べれば、操作が比較的容易であるが、なお

- 、
  - (1)PCRによる増幅操作、洗浄操作、及び電気泳動等の複数の複雑な操作が必要であるため分析に長時間を要する；
  - (2)マイクロタイタープレート等に固相したプローブを用いて多型分析を行う場合、分析すべき遺伝子の多型性が高度であれば、多量の検体及び試薬が必要となるのみならず、同時測定可能な項目の数が限られる；
  - (3)残存標識物質によるバックグラウンドの上昇や非特異的反応のため精度が十分でない；
  - (4)検査コストが高い；
- 等の欠点を有している。

#### 【0 0 0 6】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、従来技術に存する上記課題を解決するためになされたものであって、極めて多数の多型配列を迅速且つ簡便に決定する方法を提供することを目的とする。

#### 【0 0 0 7】

##### 【課題を解決するための手段】



前記課題を解決するために、本発明は、

ポリヌクレオチド中に含まれる多型部位の塩基配列が多型配列 $PS_1 \sim PS_n$  ( $n$  は2以上の整数) の何れであるかを決定する方法であって、

前記ポリヌクレオチドを含む検体を準備する工程と、

検出可能な標識がラベルされた核酸プローブ $PR_1 \sim PR_n$ であって、前記多型配列 $PS_1 \sim PS_n$ と特異的に結合し得る核酸プローブ $PR_1 \sim PR_n$ と前記検体とを混合することにより、前記核酸プローブ $PR_1 \sim PR_n$ を前記ポリヌクレオチドに結合せしめる工程と、

微小空間内に存在する前記核酸プローブ $PR_1 \sim PR_n$ を検出する工程と、

検出結果を解析して、 $PR_1 \sim PR_n$ のうちの何れが前記ポリヌクレオチドに結合したかを決定することにより、前記多型部位の塩基配列が多型配列 $PS_1 \sim PS_n$ の何れであるかを決定する工程と  
を具備する方法を提供する。

#### 【0008】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、所定のポリヌクレオチド、最も典型的には多型遺伝子中に含まれる多型部位の塩基配列を迅速且つ簡便に決定する方法を提供する。

#### 【0009】

本明細書において、「多型遺伝子」とは、一つの遺伝子座を占める複数種の対立遺伝子群、又はこのような対立遺伝子群に属する個々の対立遺伝子を指称するものとする。

#### 【0010】

「多型部位」とは、各多型遺伝子間で塩基配列が異なる部位をいう。例えば、多型遺伝子A1の塩基配列がAAA TTT CCC GGGであり、多型遺伝子A2の塩基配列がAA TTT AGT GGGである場合には、斜字体で示されている部位が多型部位に該当する。多型部位の中で、1塩基のみが異なるものは、特に「単ヌクレオチド多型」と指称するものとする。

#### 【0011】

また、「多型配列」とは、多型部位に含まれる塩基配列を意味する（上記事例

では、斜字体で示されている塩基配列)。

#### 【0012】

本発明の方法は、任意の多型遺伝子の多型部位に含まれる塩基配列を明らかにするために、すなわち多型遺伝子の型を決定するために用いることができる。

#### 【0013】

なお、以下では、本発明の方法を適用すべき多型遺伝子（以下標的多型遺伝子と称する）の多型部位中に含まれることが知られている多型配列を $PS_1 \sim PS_n$ （ $n$ は2以上の整数）と表記するものとする。例えば、上記事例においては、 $PS_1$ はCCCであり、 $PS_2$ はAGTである。

#### 【0014】

本発明の方法を用いれば、極めて迅速に多型部位の型を決定できるので、本発明の方法は、多数の多型部位を含有する多型遺伝子や多種類の多型からなる多型部位を含む多型遺伝子に適用できる。このような遺伝子としては、ヒト白血球抗原（以下HLAと称する）を含む主要組織適合抗原を挙げることができるが、これに限定されない。

#### 【0015】

本発明の方法によって、多型遺伝子の多型部位の型を決定するためには、まず、標的多型遺伝子を含む検体を準備する。本発明の方法をヒトに適用する場合、典型的には、検体は血液、骨髓液、脳脊髄液等を含む体液であり得るが、これらに限定されない。

#### 【0016】

本発明の方法は感度が高いので、従来法のように、検体を準備した後にPCR増幅する操作は省略することができるが、標的多型遺伝子が特に少量であれば、PCR増幅を行ってもよい。標的多型遺伝子をPCR増幅する場合には、型を決定すべき多型部位を挟むようにプライマー対を選択しなければならない。

#### 【0017】

続いて、多型配列 $PS_1 \sim PS_n$ と相補的な塩基配列を含む核酸プローブ $PR_1 \sim PR_n$ （ $n$ は2以上の整数）を、前記検体と混合する。核酸プローブ $PR_1$ は、多型配列 $PS_1$ と相補的な塩基配列を含むので、標的多型遺伝子の型が $PS_1$ の場合には、核

酸プローブ $PR_1$ のみが標的多型遺伝子と結合し得る。同様に、標的多型遺伝子の型が $PS_2 \sim PS_n$ の場合には、それぞれ核酸プローブ $PR_2 \sim PR_n$ が標的多型遺伝子と結合し得る。

#### 【0018】

標的多型遺伝子に未知の多型配列が存在しない限り、該多型遺伝子には、多型配列 $PS_1 \sim PS_n$ のうちの何れかが含まれるので、該多型遺伝子と核酸プローブ $PR_1 \sim PR_n$ とを混合すれば、核酸プローブ $PR_1 \sim PR_n$ の何れかが該多型遺伝子の多型部位に結合する。

#### 【0019】

核酸プローブ $PR_1 \sim PR_n$ には、検出可能な標識物質、好ましくは蛍光物質又は発光物質が標識されているので、核酸プローブが結合した多型遺伝子は、以下で詳述する検出操作で検出することが可能となる。

#### 【0020】

各核酸プローブに標識すべき標識物質は、全て同種であってもよい。しかし、何れの核酸プローブが標的多型遺伝子に結合したかを識別できるように、少なくとも2種類の標識物質を用いることが好ましい。1種類の標識物質のみを使用する場合には、例えば、各核酸プローブの長さを変えることによって、何れの核酸プローブが標的多型遺伝子に結合したかを識別することができる。

#### 【0021】

核酸プローブ $PR_1 \sim PR_n$ の何れかを標的多型遺伝子に結合させた後に、「微小空間」内に存在する核酸プローブ $PR_1 \sim PR_n$ を検出する。

#### 【0022】

本明細書において、「微小空間」とは、容積が $10^{-21}L$  (1nm四方の立方体の体積に相当する)  $\sim 10^{-3}L$ 、典型的には $10^{-18}L \sim 10^{-9}L$ 、最も典型的には $10^{-15}L \sim 10^{-12}L$ の空間をいう。微小空間の形状は、球状、円錐状、立方体状、直方体状等任意の形状であり得る。

#### 【0023】

微小空間内の標的多型遺伝子は、該遺伝子に結合した核酸プローブの標識を検出することによって検出される。前述のように、微小空間の容積は極めて小さい

ので、該検出は、レーザー光を用いて、顕微鏡視野下で微小領域内の蛍光発光を検出することが好ましい。

#### 【0024】

このような検出は、図1に示すような共焦点顕微鏡によってなし得る。共焦点顕微鏡自体は、本分野で公知である。共焦点顕微鏡を用いた検出は、

- (1) レーザー光を励起光として照射する；
- (2) フィルター(IF)を通過させた後、レーザー光を集光し、ダイクロイックミラ
- ー(DM)によって試料中の一点にレーザー光を照射する；
- (3) 試料中の蛍光物質をレーザー光で励起して蛍光発光させる；
- (4) ピンホールを通過させることにより、試料の焦点中の蛍光物質から発せられ

た蛍光のみを光増倍管(PMT)で増幅する

- (5) 増幅した蛍光を検出することによってなされる。

#### 【0025】

図では、アルゴンイオンレーザーが例示されているが、蛍光物質の種類に応じて、波長の異なるクリプトンアルゴンイオンレーザー、ヘリウムネオンレーザー、ヘリウムカドミニウムレーザーも使用できる。また、図1は、典型的な共焦点顕微鏡の模式図にすぎないので、図1に記載の共焦点顕微鏡以外のシステムも当然使用できる。

#### 【0026】

このような検出方法は、微少な一点から発せられる蛍光のみを検出するので、バックグラウンドがなく、通常の蛍光検出に比べて、感度が著しく高い。

#### 【0027】

標的多型遺伝子の検出は、一般的にはミリ秒～分の単位、最も一般的には秒の単位で行われる。

#### 【0028】

検出結果が得られたら、該結果を解析して、核酸プローブのうちの何れが標的

多型遺伝子に結合したかを決定する。標的多型遺伝子に結合した核酸プローブの種類が決定されれば、標的多型遺伝子の型が明らかになる。

### 【0029】

検出結果の「解析」は、蛍光相関分析法によって行うのが好ましい。ここで、「蛍光相関分析法（以下FCS）」とは、平均数個、ある場合には1個の蛍光物質が発する蛍光の強度を一定時間測定した後、ブラウン運動に由来する蛍光のゆらぎの自己相関関数を取り、該関数の分析によって、蛍光物質に関する種々のデータを取得する方法をいう。FCS自体は公知であり、その詳細は、特願平32017に記載されている。

### 【0030】

本発明の方法では、核酸プローブのうち何れが標的対立遺伝子に結合したかを明らかにするために、以下のようにFCSを行う。

### 【0031】

(1) 図2 a) に示されている微小領域にレーザー光を照射する。

### 【0032】

(2) 該微小領域中に存在する蛍光物質から発せられる蛍光の蛍光強度を経時的に測定し、図2 b) 及び図2 c) に示されているようなデータを取得する。

### 【0033】

(3) 異なる2時点の蛍光強度 $I(t)$ と $I(t+\tau)$ の積の期待値を計算し、自己相関関数 $G(\tau) = \langle I(t) I(t+\tau) \rangle$ を得る。

### 【0034】

(4) 下式1：

【式1】

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[ \left\{ \frac{1-y}{1+\frac{\tau}{\tau_{free}}} \sqrt{\frac{1}{1+S^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_{free}}}} \right\} + \left\{ \frac{y}{1+\frac{\tau}{\tau_{poly}}} \sqrt{\frac{1}{1+S^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_{poly}}}} \right\} \right]$$

### 【0035】

(ここで、N：蛍光分子の平均数

$\tau_{free} = w_0^{2/4} D_{free}$ ：遊離の核酸プローブの並進拡散時間

$\tau_{\text{bound}} = w_0^2 / 4D_{\text{bound}}$ : 結合した核酸プローブの並進拡散時間

$y$ : 結合した核酸プローブの割合

$S = w_0 / z_0$ である

(なお、 $w_0$ は検出領域の径、 $2z_0$ は領域長、 $D_{\text{free}}$ と $D_{\text{bound}}$ は、それぞれ遊離の核酸プローブ及び結合した核酸プローブの並進拡散定数である))

を用いて、(3)で得た自己相関関数を解析する。

#### 【0036】

(5)各核酸プローブについて、添加前と添加後の自己相関関数を比較する。

#### 【0037】

FCSによるデータ解析には、Evotec BioSystems社から発売されているコンピュータープログラム「FCS」を使用できる。

#### 【0038】

このような分析の概念は、図2b)及び図2c)によって、より明確となろう。すなわち、蛍光強度の関数 $I(t)$ は、核酸プローブが標的対立遺伝子に結合していない場合には、分子のサイズが小さいのでブラウン運動の速度が大きく、 $I(t)$ の周波数が高い。これに対して、核酸プローブが標的対立遺伝子に結合すると

、  
図2b)のように、周波数の大きいデータが得られる。それ故、上述のごとく、蛍光強度を基にして得られた自己相関関数を解析すれば、プローブが結合したか否かが明らかとなるわけである。

#### 【0039】

FCSによって、何れの核酸プローブが結合したのかを決定するためには、例えば、各核酸プローブを励起波長及び／又は蛍光波長の異なる蛍光標識で区別すればよい。

#### 【0040】

また、各核酸プローブのサイズが異なれば、ブラウン運動の変化及び自己相関関数も異なるので、サイズの異なる核酸プローブを用いることによって何れの核酸プローブが結合したかを決定することもできる。もちろん、サイズと蛍光標識の両者を組み合わせることによって、標的対立遺伝子に結合した核酸プローブの

種類を決定してもよい。

#### 【0041】

上記のようなハイブリダイゼーション反応を指標とした検出のみならず、プローブとして用いた標識配列をプライマーとして用いてPCR反応を行い、増幅産物の標識種類の判別によっても標的対立遺伝子を決定することが可能である。また、こうしたPCR反応を指標とする可能である。また、こうしたPCR反応を指標とする場合、多型によって増幅産物のサイズが異なるようにプライマーの設計をすることにより、増幅産物のサイズの差異に基づく自己相関関数の差によって標的対立遺伝子の型を決定することができる。

#### 【0042】

このように、本発明の方法を用いれば、極めて迅速且つ簡便に標的対立遺伝子の多型部位の型を決定できる。

#### 【0043】

以下、本発明の実施例として、HLAの型を決定する方法について説明する。

[実施例1] (図3参照)

本実施例では、HLAクラスII領域DRB1のアロ抗原性を示す多型配列の型を決定する。DR2のサブタイプであるDRB1\*15 (配列番号1) とDRB1\*16 (配列番号2) は、141番目のヌクレオチド (T→C) と180番目のヌクレオチド (G→C) のみが異なっている。

#### 【0044】

DRB1\*15の141～180番目の塩基配列と相補的な塩基配列を有するプローブ1と、DRB1\*16の141～180番目の塩基配列と相補的な塩基配列を有するプローブ2を調製し、プローブ1はフルオレセインイソチオシアネート (FITC)、プローブ2はローダミンで標識する。プローブ1及びプローブ2が、各々 $10^{-8}$ M程度の濃度になるように溶液に加える。

#### 【0045】

コンセンサス領域に特異的に結合し得るプライマー対を用いたPCR反応により、60～200番目の塩基配列を増幅し、 $10^{-8}$ 程度の濃度になるように溶液を加えて、DNA検体を調製する。

**【0046】**

カバーガラスの面に該DNA検体を1滴載置し、プローブ1とプローブ2を添加した後、58～60℃前後のハイブリダイゼーション反応を行う。

**【0047】**

ハイブリダイゼーション反応の前後における、蛍光発光の自己相関関数の変化を測定する。

**【0048】**

例えば、検体DNAの型がDRB1\*15のホモである場合には、プローブ1のみが結合するので、FITCから発せられる黄緑色の蛍光の自己相関関数のみが増加する。他方、検体DNAの型がDRB1\*16のホモである場合には、プローブ2のみが結合するので、ローダミンから発せられる黄緑色の蛍光の自己相関関数のみが増加する。また、検体DNAの型がDRB1\*15とDRB1\*16のヘテロである場合には、プローブ1とプローブ2が共に結合するので、FITCから発せられる蛍光とローダミンから発せられる蛍光の自己相関関数が共に増加する。もし、検体DNAの型がDRB1\*15とDRB1\*16の何れでもなければ、自己相関関数は全く増加しない。

**【0049】**

このように、プローブ1とプローブ2は異なる標識物質でラベルされているので、同一の容器中に添加しても、何れのプローブが検体DNAと結合したかを決定できる。近年、HLAには多くの多型部位が存在するので、多種類のプローブを同時に同じ容器に添加して分析できることは、本発明の方法の大きな利点である。

**【0050】**

本実施例では、異なる標識物質でラベルされたプローブを用いる方法を記載したが、長さが異なるプローブを用いてもよい。この場合、各プローブの長さは、FCSによってゆらぎの差異を判別できるように選択しなければならない。例えば、

DRB1\*15とDRB1\*16を判別する上記事例においては、プローブ1とプローブ3（配列番号3；プローブ1より20塩基長い）を使用することができる。

**【0051】**

図4には、本実施例の方法の臨床検査への応用を示した。該応用によれば、多



数の多型配列のサブクラスの型を迅速に決定できるので、多数の多型部位が存在し、多型部位毎に多くのサブクラスが同定されているHLAの型を決定するのに有用である。

#### 【0052】

図4から明らかなように、該方法では、ガラス平板上の各窪みの中には、HLAの多型配列（A2、A26、B40…等）がそれぞれ各別に添加した後、各多型配列のサブクラスと特異的に結合し得るプローブ群を加える。続いて、本実施例で詳述したように、各窪み毎に何れのプローブが結合したかを決定すれば、多数の多型配列のサブタイプを決定することができる。勿論、前記窪みの中に添加すべき多型配列はHLAのみに限らない。また、各窪みには、全く種類の異なる多型遺伝子を添加してもよい。

#### 【0053】

##### 【発明の効果】

本発明の方法によれば、多種類のポリヌクレオチド中の多型部位を迅速且つ簡便に決定できる。

##### 【配列表】

##### SEQUENCE LISTING

<110> Olympus Optical Co., Ltd.

<120> Method for determining a polymorphic sequence

<130>

<140>

<141>

<160> 3

<170> PatenIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 42

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

agaaacccca cctccgaggg tcctcctccg ccgcgcccga cg 42

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggaaacccca cctccgaggg tcctcctccg ccgcgcccga cg 42

<210> 3

<211> 59

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

tcgtctctca cagaaacccc acctccgagg gtcctcctcc gccgcgcccg cgccacga 59

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の方法に使用し得る検出システムの模式図。

【図 2】

本発明の方法による多型配列の決定方法の概念を表す図。

【図 3】

実施例 1 で用いたプローブを示す図。

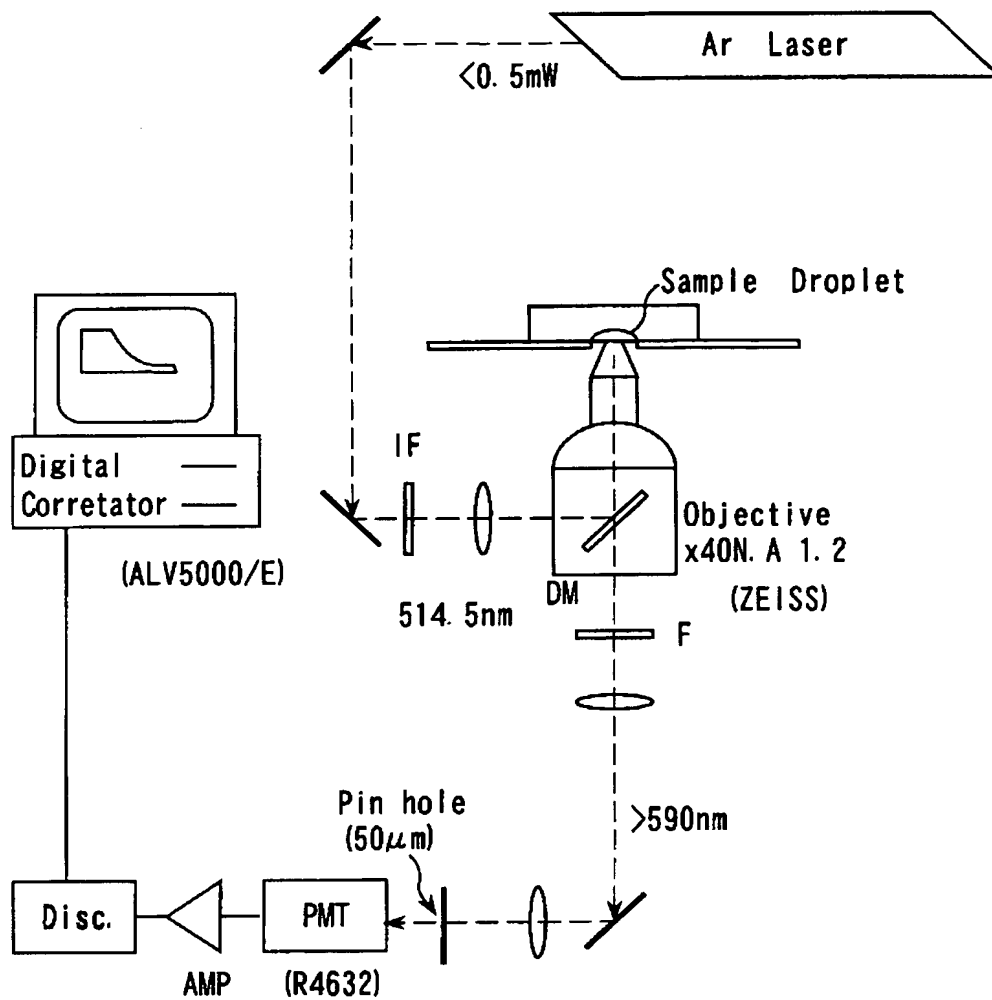
【図 4】

本発明の方法の臨床医学への応用例を示す図。

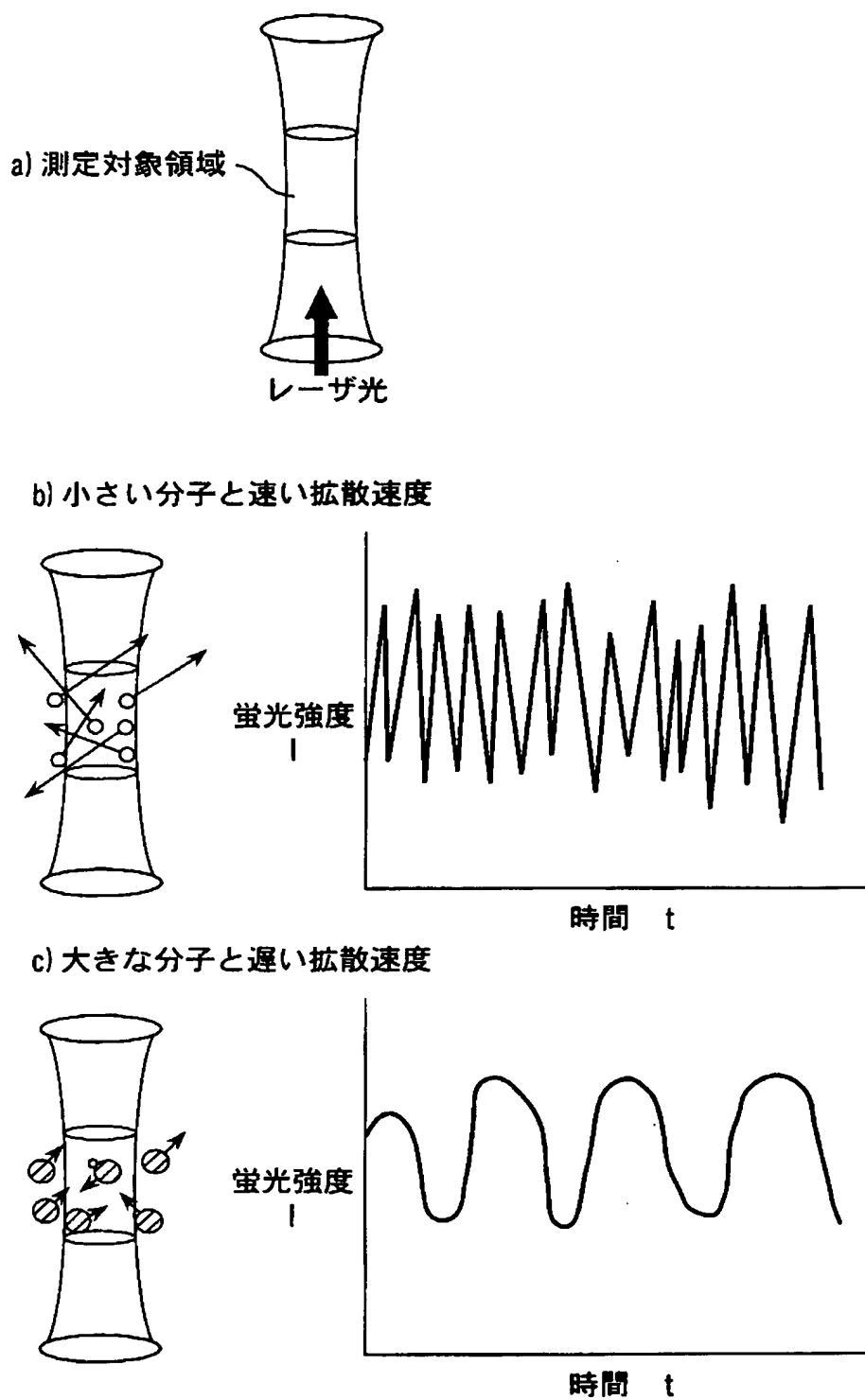
【書類名】

図面

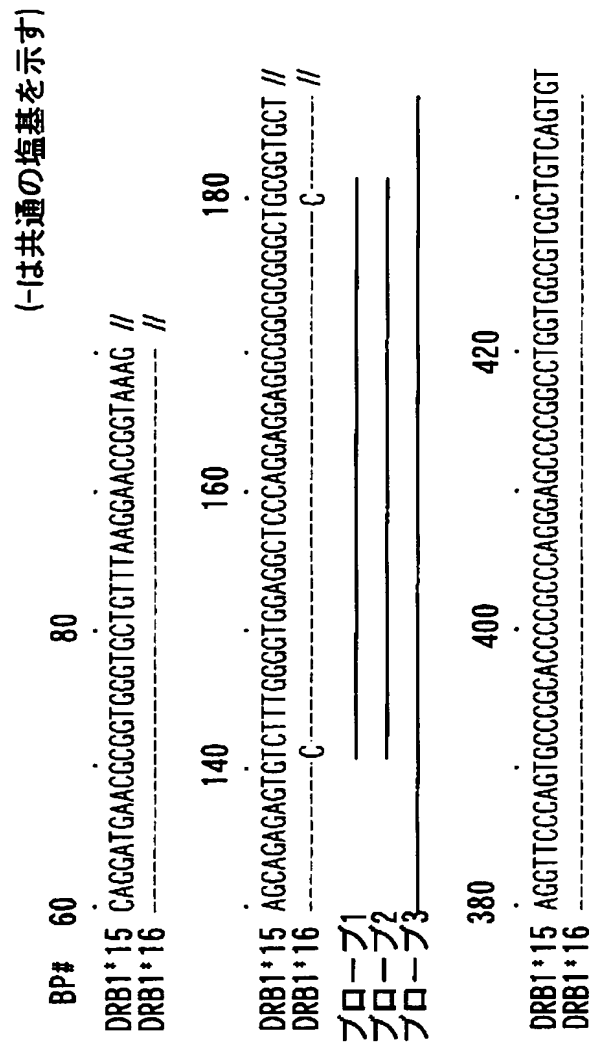
【図 1】



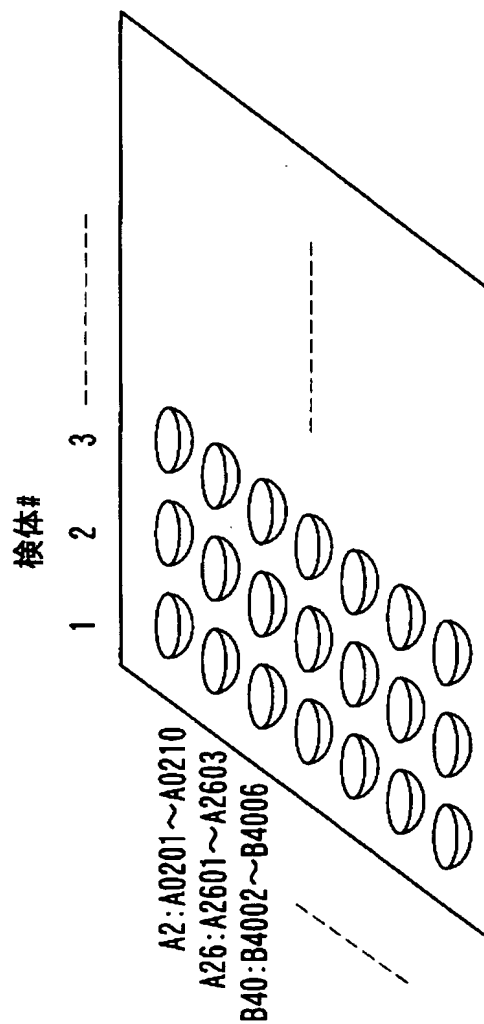
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、ポリヌクレオチド中に含まれる多型部位の多型配列を迅速且つ簡便に決定する方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 前記課題を解決するために、本発明は、

ポリヌクレオチド中に含まれる多型部位の型を決定する方法であって、

前記ポリヌクレオチド中に含まれ得る多型配列に結合し得る 1 種類以上のプローブと前記ポリヌクレオチドとを混合する工程と、

共焦点顕微鏡を用いて、微小空間内に存在する前記ポリヌクレオチドを検出する工程と、

蛍光相関分析法を用いて検出結果を解析して、前記ポリヌクレオチドに結合したプローブの種類を決定することにより、前記多型部位の型を決定する工程とを具備する方法を提供する。

【選択図】 なし



特願 2 0 0 0 - 0 8 7 5 0 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 0 3 7 6 ]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 2 0 日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号  
氏 名 オリnpas 光学工業株式会社
2. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号  
氏 名 オリnpas 株式会社